

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



REC'D 28 MARS 2000

EPO - Munich  
63

WIP

PCT

15. März 2000

## Bescheinigung

Herr Professor Dr. Walter S e b a l d in Würzburg/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Protein mit einem Heparin-bindenden Epitop"

am 13. Februar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 29. Februar 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 06 096.7

Wallner

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

# P A T E N T A N S P R Ü C H E

=====

5 1. Protein mit einem Heparin-bindenden Epitop bestehend aus einem Protein aus der TGF- $\beta$  Superfamilie, die unter anderem TGF- $\beta$ - und/oder BMP- und/oder GDF-Proteine enthält, **dadurch gekennzeichnet**, daß Aminosäuren der Sequenz ( $x_1$   $x_2$   $x_3$   $x_4$   $x_5$   $x_6$ )<sub>1-4</sub> an das Protein aus der TGF- $\beta$  Superfamilie  
10 angelagert sind, wobei entweder

$x_1$  = K, R oder H;  $x_2$  = K, R oder H;  $x_3$  = K, R, H, oder keine AS;  $x_4$  = kein K, R, H, sonst beliebige  
15 AS;  $x_5$  = kein K, R, H, sonst beliebige oder keine AS;  $x_6$  = kein K, R, H, sonst beliebige oder keine AS, ()<sub>1-4</sub> bezeichnet, daß sich diese Sequenz ein- bis viermal wiederholen kann, bedeutet

20 oder

$x_1$  = K, R oder H;  $x_2$  = kein K, R, H, aber sonst beliebige AS;  $x_3$  = K, R oder H;  $x_4$  = kein K, R, H, sonst beliebige AS;  $x_5$  = kein K, R, H, sonst beliebige oder keine AS;  ~~$x_6$~~   $x_6$  = kein K, R, H, sonst beliebige oder keine AS, ()<sub>1-4</sub> bezeichnet, daß sich  
25 diese Sequenz ein- bis viermal wiederholen kann, bedeutet.

30

2. Protein nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die N-terminale Sequenz des Proteins aus der

TGF- $\beta$  Superfamilie ganz oder teilweise durch Aminosäuren der Sequenz nach Anspruch 1 ersetzt ist.

5            3. Protein nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**,  
daß das Protein vor der N-terminalen Sequenz zusätzliche Aminosäuren der Sequenz M oder MX oder MXX enthält.

10

4. Verwendung von Proteinen nach Anspruch 1 bis 3, als Arzneimittel, **dadurch gekennzeichnet**, daß es zur Behandlung von Knochenschäden, Knorpelschäden und/oder zur Stimulierung des Knochenwachstums  
15 eingesetzt wird.

15

Protein mit einem Heparin-bindenden Epitop  
-----

5 Die Erfindung bezieht sich auf ein Protein mit einem Heparin-bindenden Epitop bestehend aus einem Protein aus der TGF- $\beta$  Superfamilie, die unter anderem TGF- $\beta$ - und/oder BMP- und/oder GDF-Proteine enthält und einer Aminosäuresequenz.

10 Die Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie, die neben TGF- $\beta$ -, BMP- und GDF-Proteinen, Inhibine, Aktivine und weitere Proteine umfaßt (siehe Kingsley, 1994, Genes Dev 8, 133-46), wirken als wichtige Regulatoren der Entwicklung und Differenzierung von Zellen, Gewe-  
15 ben und Organen im sich entwickelnden wie auch im erwachsenen Organismus (Reddi, 1998, Nat Biotechnol 16, 247-52). Dabei steht TGF für "transforming growth factor"; BMP für "bone morphogenetic protein" und GDF für "growth and differentiation factor". Von besonderer Bedeutung sind neben den  
20 TGF- $\beta$ 's einzelne Vertreter der BMP's, wie BMP-2 und BMP-7/OP-1, und der GDF's, wie GDF-5/CDMP-1, die die Entwicklung und Regenerierung von Knochen und Knorpelgewebe in Gang setzen können.  
25

Die TGF- $\beta$  Superfamilie umfaßt derzeit mehr als 20 verschiedene Proteine, deren Aminosäuresequenzen der umfangreichen Fachliteratur zu entnehmen sind  
30 (siehe Kingsley, 1994, Genes Dev 8, 133-46). Die Proteine bestehen aus zwei, durch eine Disulfidbrücke verknüpfte Polypeptidketten. Kennzeichnendes Merkmal aller bis jetzt strukturell untersuchten

Proteine dieser Familie ist das "TGF- $\beta$ /BMP Gerüst" (Griffith, 1996, Proc Natl Acad Sci U S A 93, 878-83), das in jedem Monomer aus einem "Cystinknoten" (Mc Donald and Hendrickson, 1993, Cell 73, 421-4), einer  $\alpha$ -Helix und mindestens vier  $\beta$ -Strängen besteht, und das eine besondere Anordnung der Monomeren zeigt. Besonders unterscheiden sich diese Proteine durch die Aminosäuresequenzen in den Loopregionen sowie in den N-terminalen Sequenzen, soweit sie vor dem ersten Cystein des Cysteinknotens liegen.

Die Proteine der TGF-Superfamilie werden in der Zelle zuerst als große Proproteine synthetisiert, aus denen dann das reife Protein durch Proteolyse entsteht. Das Proprotein scheint nach einer RXXR Erkennungssequenz gespalten zu werden, so daß eine C-terminale Sequenz von etwa 100 bis 140 Resten, die das reife Protein repräsentiert, frei gesetzt wird.

Die Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie beeinflussen Zellen im Organismus, indem sie mit Rezeptoren an der Zelloberfläche interagieren (Massague, 1998, Annu. Rev. Biochem. 67, 753-91). Außer mit den für die Funktion essentiellen Rezeptoren können Proteine der TGF- $\beta$  Sußerfamilie mit anderen Proteinen interagieren. Beispielsweise ist bekannt, daß das Fetuin/ 2-HS Glykoprotein Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie bindet, wobei diese Bindung mit der Bindung des Proteins an den Rezeptor kompetiert (M. Deme-triou et al., 1996, J Biol Chem 271, 12755-61). Dadurch kann die Aktivität, d. h. die Entfaltung der

Wirkung der Proteine durch Bindung an den Rezeptor, gehemmt werden.

5 Der Nachteil der Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie besteht darin, daß sie nicht oder nur ungenügend an Heparin-ähnliche Strukturen der extrazellulären Matrix oder der Zelloberfläche ankoppeln, und so nur ungenügend am Ort ihrer Applikation konzentriert und zurückgehalten werden können. Diese Heparin-ähnlichen Strukturen treten in Glykosamino-  
10 glykanen, d. h. unter anderem in Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat auf, die als Bestandteil von Proteoglykanen weit verbreitet in der extrazellulären Matrix und auf  
15 der Zelloberfläche auftreten (Jackson, 1991, *Physiol. Rev* 71, 481-539).

20 Der Erfindung liegt das Problem zugrunde, die Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie so zu verändern, daß sie sich verstärkt an Heparin-ähnliche Strukturen anlagern können, und gleichzeitig die Bindung der Proteine an den zellulären Rezeptor nicht beeinträchtigt wird.

25 Dieses Problem wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß an das Protein aus der TGF- $\beta$  Superfamilie zusätzliche Aminosäuren der Sequenz  $(x_1 \ x_2 \ x_3 \ x_4 \ x_5 \ x_6)_{1-4}$  angelagert werden.

30 Der Kerngedanke der Erfindung besteht darin, die therapeutisch wirksamen Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie mit einem Heparin-bindenden Epitop zu versehen, wobei unter dem Begriff Heparin-bindendes



Epitop zu verstehen ist, daß die zusätzliche Aminosäuresequenz ein funktionelles Epitop bildet, das sich bevorzugt an Heparin oder Heparin-ähnliche Strukturen anlagert. Solche erfindungsgemäßen Proteine sind durch das Heparin-bindende Epitop in der Lage, sich an die Heparin-ähnliche Strukturen der Proteoglykane in der extrazellulären Matrix bzw. der Zelloberfläche anzulagern. Durch diese Anlagerung erfahren sie eine Lokalisierung und können am Ort ihre therapeutisch gewünschte Wirkung entfalten. Dies ermöglicht die Einstellung einer optimalen Dosis bezüglich Konzentration und zeitlichem Verlauf des Einflusses der Proteine, sowie die örtliche Begrenzung der zellulären Wirkung und die Erhöhung der Spezifität der Wirkung der Proteine. Die Wirkungsweise des Heparin-bindenden Epitops besteht darin, daß die eingefügten Aminosäuren sich an die Heparin-ähnlichen Strukturen binden. Das genaue Prinzip der Bindung ist nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, daß eine elektrostatische Anziehung zwischen den negativ geladenen Gruppen der Heparin-ähnlichen Struktur und den positiv geladenen Gruppen in der zusätzlichen Aminosäuresequenz bewirkt wird. Es ist aber auch möglich, daß bei dem sich anlagernden Heparin-bindenden Epitop die doppelt und/oder dreifach aufeinanderfolgenden basischen Aminosäuren ein komplementäres Ladungsmuster zu den geladenen Gruppen in den Heparin-ähnlichen Strukturen ausbilden, so daß hier möglicherweise über komplementär angeordnete Ladungen eine spezifische und kooperative Bindung zustande kommt (Mulloy, Biochem J, 293, 849-858).

Als Aminosäuresequenzen zur Bildung eines Heparinbindenden Epitops werden zwei Formulierungen angegeben, für die Patentschutz beantragt wird:

5

$(x_1 x_2 x_3 x_4 x_5 x_6)_{1-4}$

dabei bedeutet  $x_1 = K, R$  oder  $H$ ;  $x_2 = K, R$  oder  $H$ ;  $x_3 = K, R, H$ , oder keine AS;  $x_4 =$  kein  $K, R, H$ , sonst beliebige AS;  $x_5 =$  kein  $K, R, H$ , sonst beliebige oder keine AS;  $x_6 =$  kein  $K, R, H$ , sonst beliebige oder keine AS.  $()_{1-4}$  bezeichnet, daß sich diese Sequenz ein- bis viermal wiederholen kann,

10

oder

15

$(x_1 x_2 x_3 x_4 x_5 x_6)_{1-4}$

dabei bedeutet  $x_1 = K, R$  oder  $H$ ;  $x_2 =$  kein  $K, R, H$ , aber sonst beliebige AS;  $x_3 = K, R$  oder  $H$ ;  $x_4 =$  kein  $K, R, H$ , sonst beliebige AS;  $x_5 =$  kein  $K, R, H$ , sonst beliebige oder keine AS;  $x_6 =$  kein  $K, R, H$ , sonst beliebige oder keine AS.  $()_{1-4}$  bezeichnet, daß sich diese Sequenz ein- bis viermal wiederholen kann, wobei zur Bezeichnung der Aminosäuren der Einbuchstaben-Code verwendet wird und AS für Aminosäure steht.

20

25

30

Die Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins mit einer zusätzlichen Aminosäuresequenz stellt für den Fachmann kein Problem dar und soll hier kurz beschrieben werden. Die Aminosäuresequenz eines TGF- $\beta$  Proteins ist bekannt. Es ist also möglich, ein Polynukleotid herzuleiten, das dieses Protein kodiert. Das benötigte Polynukleotid kann entweder

vollkommen synthetisch hergestellt werden, es ist  
aber auch möglich, dieses aus der RNA einer Zelle,  
die das entsprechende Protein produziert,  
herzustellen. Die hierzu verwendeten gentechnolo-  
gischen Verfahren sind beispielsweise in "Current  
5 Protocols in Molecular Biology" (Verlag John Wiley  
and Sons, Kap. 15.4.1 bis 15.4.6.) beschrieben. Die  
Nukleotidsequenz, mit der die zusätzlichen Amino-  
säuren kodiert werden, kann entweder in dem  
10 vollständig synthetischen Polynukleotid bereits  
enthalten sein, oder beispielsweise durch eine  
synthetische doppelsträngige DNA mit Hilfe einer  
Kassetten-Mutagenese in das Polynukleotid einge-  
führt werden. Die entsprechenden Methoden sind  
15 Stand der Technik. Die so erhaltenen Polynukleotide  
werden in einen Expressionsvektor eingefügt und in  
geeignete E. coli Bakterien implantiert. Unter  
geeigneten Umgebungsbedingungen, d.h. Temperatur,  
Nährlösung etc. produzieren die so transformierten  
20 Bakterien das gewünschte Protein. Das Protein kann  
anschließend z. B. mit 4 M Guanidiniumchlorid aus  
den Zellen gelöst werden. Auch die Renaturierung  
bzw. die Reinigung des Proteins über chromato-  
graphische Techniken ist bekannt. Mit diesen  
25 Vorgehen wird also ein erfindungsgemäßes Protein  
erhalten. Auch die Weiterverarbeitung, sprich die  
Konfektionierung zu einem geeigneten Arzneimittel,  
das in beliebiger Weise appliziert werden kann,  
stellt für den Fachmann kein Problem dar.

30

Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind Ge-  
genstand von Unteransprüchen.

Eine mögliche Ausgestaltung der Erfindung besteht nun darin, die N-terminale Sequenz eines Proteins der TGF- $\beta$  Superfamilie, d.h. die Sequenz vor dem ersten Cystein des Cystinknotens, ganz oder teilweise durch eine erfindungsgemäße Aminosäuresequenz zu ersetzen. Dadurch erhält das Protein ebenfalls ein zusätzliches Heparin-bindendes Epitop. Da die N-terminale Sequenz für die Rezeptorbindung des Proteins nicht von entscheidender Bedeutung ist, kann sie durch eine entsprechende Aminosäuresequenz ersetzt werden. Der Vorteil besteht darin, daß das Molekulargewicht eines solchen Proteins nicht oder nur geringfügig vom Molekulargewicht des ursprünglichen Proteins abweicht, wohingegen bei der bloßen Hinzufügung von Aminosäuren das Molekulargewicht des Proteins deutlich größer wird.

Zusätzlich zu der Aminosäuresequenz, die ein Heparin-bindendes Epitop darstellt, kann vor der N-terminalen Sequenz des Proteins eine weitere Folge von Aminosäuren eingebaut werden mit der Sequenz M oder MX oder MXX, wobei X eine beliebige Aminosäure bedeutet. Diese zusätzlichen Aminosäuren dienen bei der ribosomalen Proteinsynthese in der Zelle als Startsignal.

Die biologische Aktivität der Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie ist wohlbekannt (l. Reddi, Nat. Biotechnol., 16, 247-252). Beispielsweise regen BMPs und GDFs die Neubildung und Wiederherstellung des Knochen- und Knorpelgewebes an. Dadurch können sie also als therapeutisches Mittel bei Krankheiten oder Schädigungen des Knochenapparates eingesetzt

werden. Durch ihre synthetisch hinzugefügten Aminosäuresequenzen lagern sie sich bevorzugt an die Heparin-ähnlichen Strukturen der extrazellulären Matrix an, wie sie innerhalb und in unmittelbarer Umgebung dieses Gewebetyps vorhanden sind. Dadurch können bei lokaler Applikation der veränderten Proteine im Organismus Knochen- und Knorpelbildende Zellen angeregt werden, an einem bestimmten Ort neues Knochen- und Knorpelgewebe aufzubauen. Die Konfektionierung der mit Hilfe der Gentechnik hergestellten Proteine zu einem Arzneimittel das "in vivo" in beliebiger Weise appliziert wird, ist für den Fachmann kein Problem und kann in vielfältiger Art und Weise geschehen. Besonders seien hier die Erkrankungen und Defekte des Knochenapparates oder auch Schädigungen von Gelenkknorpeln erwähnt, für die die modifizierten Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie als Arzneimittel verwendet werden sollen.

Weitere Einzelheiten, Merkmale und Vorteile der Erfindung lassen sich dem nachfolgenden Beschreibungsteil entnehmen, in dem anhand von Zeichnungen ein Ausführungsbeispiel der Erfindung näher erläutert ist. Es zeigen:

**Figur 1:** zeigt die Strukturformeln von typischen Heparin-ähnlichen Strukturen,

**Figur 2:** zeigt den zeitlichen Verlauf der Bindung verschiedener Proteine an Heparin,

**Figur 3:** zeigt den zeitlichen Verlauf der Bindung

verschiedener Proteine an einen Rezeptor.

5 An den in Figur 1 gezeigten Strukturformeln sind  
die negativ geladenen Gruppen, die an den Disaccha-  
rid-Einheiten auftreten, deutlich zu erkennen. Es  
handelt sich hierbei vor allem um Carboxylat- und  
Sulfat-Gruppen. An diesen Heparin-ähnlichen  
Strukturen lagern sich bevorzugt die zusätzlichen  
10 Aminosäuresequenzen in den erfindungsgemäßen Pro-  
teinen an, da sie über mehrere positivgeladene  
Gruppen verfügen.

15 In Figur 2 ist der zeitliche Verlauf der Bindung  
von BMP-2, das eines der die Knochenbildung  
induzierenden "bone morphogenetic proteins" ist, an  
eine Heparin-ähnliche Struktur gezeigt. Im  
Vergleich dazu ist die Bindung zweier Protein-  
varianten (T3 und T4), die mit einem Heparin-  
bindenden Epitop versehen sind, ebenfalls darge-  
stellt. Mit dem Heparin-bindenden Epitop ist also  
20 die Bindungsfähigkeit an eine Heparin-ähnliche  
Struktur mehr als verdoppelt und die Abdisso-  
ziierung des Proteins wird ebenfalls stark  
verzögert. Von entscheidender Bedeutung ist jedoch,  
25 daß die Rezeptorbindung des Proteins durch die  
zusätzliche Aminosäuresequenz nicht verändert  
wird.

30 Um dies zu beurteilen, wurde sowohl die Bindung  
von BMP-2, das als Kontrolle dient, als auch die  
Bindung der mit einem Heparin-bindenden Epitop  
versehen Varianten (T3 und T4) an einen BMP-  
Rezeptor untersucht. Die Meßergebnisse des

zeitlichen Verlaufs der Bindung des Proteins und seiner Varianten an den Rezeptor sind in Figur 3 wiedergegeben. Durch die Veränderung des Proteins wird die Bindung an den Rezeptor, sowohl was die Affinität als auch was die Geschwindigkeit der Anlagerung betrifft, nicht beeinflußt. Der entscheidende Befund besteht darin, daß die Rezeptorbindung unabhängig von der Bindung an die Heparin-ähnlichen Struktur erfolgt.

5

10

## Z U S A M M E N F A S S U N G

=====

5

Protein mit einem Heparin-bindenden Epitop

-----

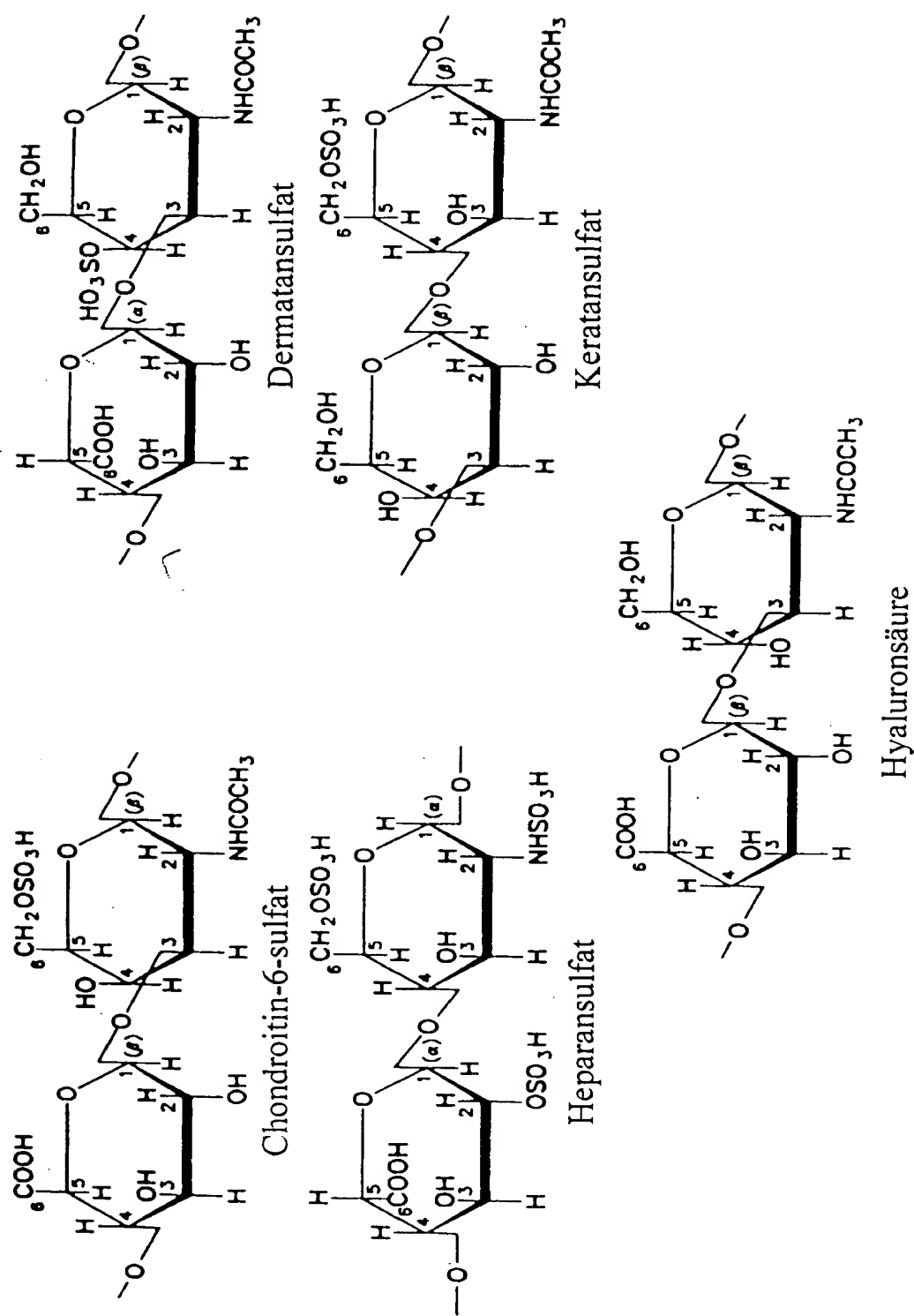
10

Protein mit einem Heparin-bindenden Epitop bestehend aus einem Protein aus der TGF- $\beta$  Superfamilie, die unter anderem TGF- $\beta$ - und/oder BMP- und/oder GDF-Proteine enthält und wobei Aminosäuren der Sequenz  $(x_1 x_2 x_3 x_4 x_5 x_6)_{1-4}$  an das Protein aus der TGF- $\beta$  Superfamilie angelagert sind.

15

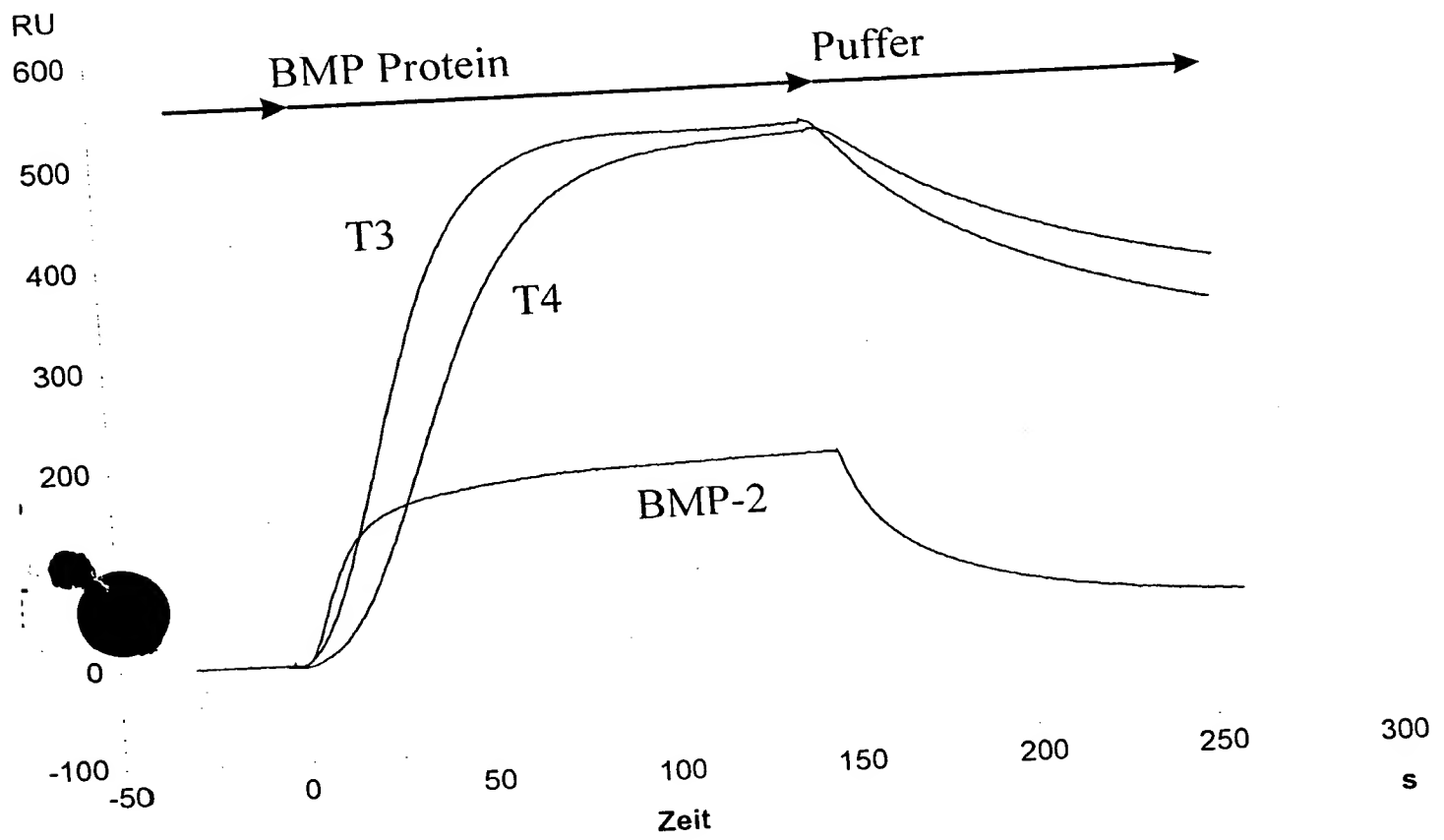
- Figur 2 -





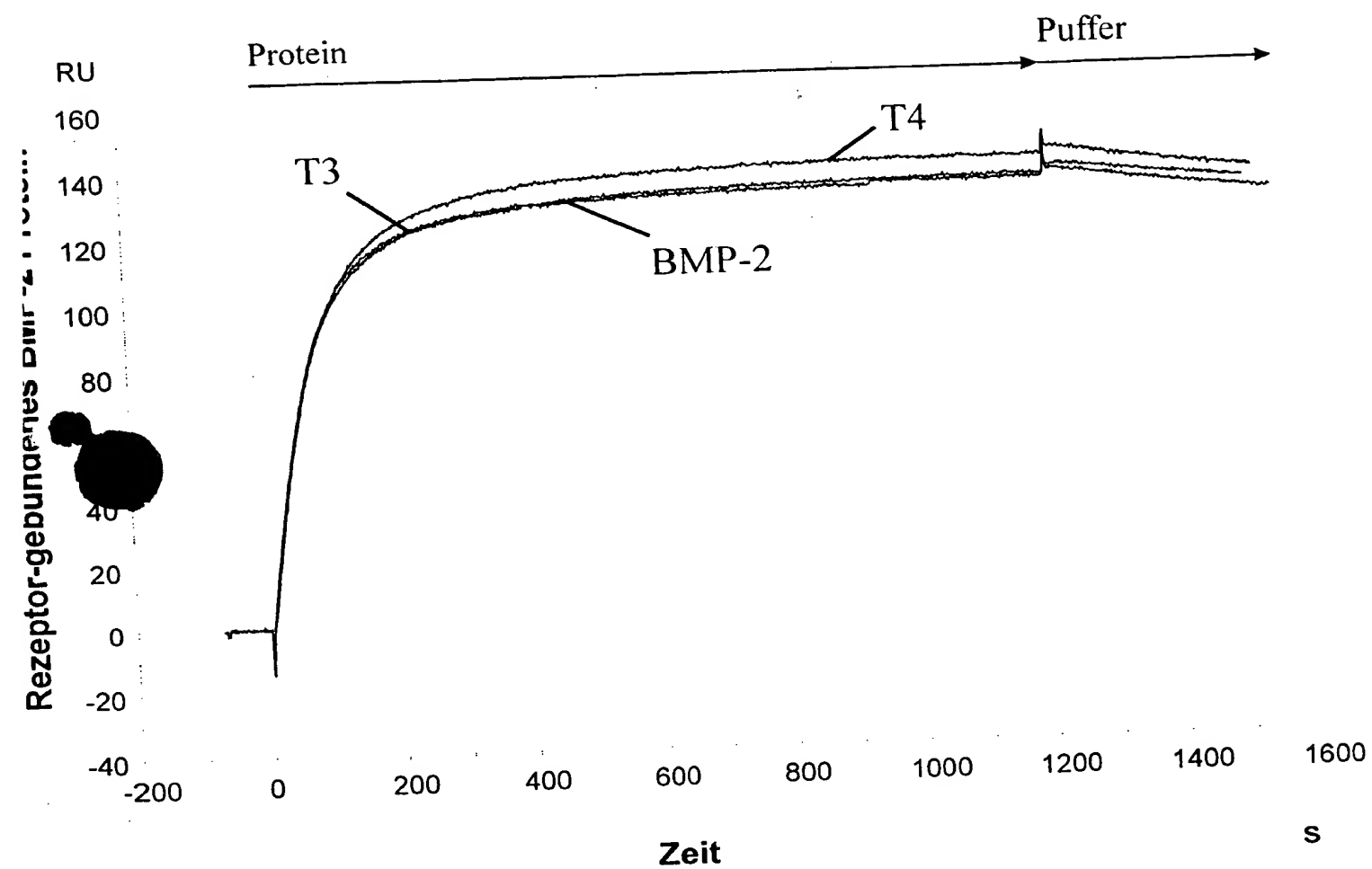
Figur 1

# Heparinbindende BMP Varianten



Figur 2

# Rezeptorbindung von BMP-2 Varianten (BMPR-IA Ektodomäne)



	$K_d$
BMP-2	320pM
T3	200pM
T4	340pM

Figur 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**